remel

BactiDrop™ Calcofluor White (English)

INTENDED USE
Remel BactiDrop Calcofluor White is a rapid, non-specific fluorochrome stain recommended for use in qualitative procedures for the initial microscopic detection of fungal elements, yeasts, *Acanthamoeba* cysts, microsporidia, and *Pneumocystis carinii* in clinical specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION
In 1961, Darken reported the uptake of a fluorescent brightener, calcofluor white, by actively growing cultures of yeast and higher fungi.[1] Hageage and Harrington described the use of calcofluor white (CFW) to demonstrate hyphae and yeasts in clinical specimens.[2] Monheit et al. applied this stain to frozen sections of lung and soft tissues for the intraoperative diagnosis of fungal infection.[3] More recently calcofluor white has been used in the detection of fungi in direct preparations and in deparaffinized tissue sections.[4,5] Baselski and Robison reported the use of calcofluor white in the detection of *P. carinii* cysts in bronchoalveolar lavage (BAL) specimens.[6] Milligan confirmed these findings in 1992, reporting BAL samples useful for detection of infections caused by other opportunistic fungi, as well as *P. carinii* in immunocompromised patients.[7] Wilhelmus et al. demonstrated the fluorescence of *Acanthamoeba* keratitis in corneal scrapings by the CFW stain.[8] Weber et al. reported that chemofluorescent optical brightening agents, such as calcofluor white, also stain microsporidia spores.[9]

PRINCIPLE
Calcofluor white is a non-specific fluorochrome with an ability to bind with cellulose and chitin. Upon excitation with longwave ultraviolet light, this compound functions to delineate the cell walls of cellulose-containing organisms.[2] Prior to staining with calcofluor white, potassium hydroxide is used to act as a clearing agent by dissolving tissue cells. Evans blue dye is incorporated in the stain to minimize background material.

REAGENTS (CLASSICAL FORMULA)*
Calcofluor White (CAS 4404-43-7)..1.0 g
Evans Blue Dye (CAS 314-13-6) ....0.4 g
Demineralized Water (CAS 7732-18-5).......................................1000.0 ml

*Adjusted as required to meet performance standards.

PRECAUTIONS
CAUTION! May cause eye, skin, and respiratory tract irritation. The toxicological properties of this material have not been fully investigated.

This product is for *In Vitro* diagnostic use and should be used by properly trained individuals. Precautions should be taken against the dangers of microbiological hazards by properly sterilizing specimens, containers, and media after use. Directions should be read and followed carefully.

STORAGE
This product is ready for use and no further preparation is necessary. Store product in its original container at 20-25°C until used. Do not freeze or overheat. Protect from light.

PRODUCT DETERIORATION
This product should not be used if (1) there is evidence of dehydration, (2) the color has changed, (3) the expiration date has passed, or (4) there are other signs of deterioration. The expiration date applies to the product in its intact container when stored as directed. Discard remaining portion of partially used ampule at end of workday.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE, AND TRANSPORT
Specimens should be collected and handled following recommended guidelines.[10]

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED
(1) Loop sterilization device, (2) Inoculating loop or needle, swabs, collection containers, (3) Incubators, alternative environmental systems, (4) Supplemental media, (5) Quality control organisms, (6) Glass slides, coverslips, (7) Fluorescent microscope,* (8) BactiDrop Potassium Hydroxide (10%) (R21524), (9) Slide warmer, (10) 100% ethanol, (11) 95% ethanol, (12) Methanol, (13) Xylene substitute.

*A fluorescent microscope with an exciter filter ranging between 400-500 nm with a peak of 440 nm and a barrier filter of 500-520 nm is recommended for optimum results. Consult fluorescent microscope manufacturer for filter recommendations suitable for the fluorescence of calcofluor white.

PROCEDURE
Place dropper in the assembled, reusable ampule crusher provided. Hold the dropper/crusher in an upright position and lightly tap the bottom to dislodge any bubbles that may have formed. Grasp the middle of the dropper/crusher with the thumb and forefinger, and with the tip pointing away, press gently to crush the ampule. Invert dropper and squeeze slightly to dispense in a dropwise fashion.

Fungal elements and yeast:
1. Place specimen on a clean glass slide and allow to dry on slide warmer at 60°C.
2. Add 1 drop of BactiDrop Potassium Hydroxide (10%) and mix gently.
3. Add 1 drop of BactiDrop Calcofluor White and mix gently.
4. Cover slide with a clean glass coverslip and examine the specimen using a fluorescent microscope. Observe for fluorescence and typical morphology.

***Acanthamoeba* cysts:**
1. Place the specimen on a clean glass slide and allow to air dry. Appropriate specimens for slide preparation are corneal scrapings or biopsy, conjunctiva or corneal ulcer, contact lens paraphernalia, and concentrated water samples of at least 100 ml. Other specimens may be utilized if the infection is disseminated.
2. Fix slide in methanol for 2 minutes.
3. Paraffinized sections (6 µm thick) may also be used. Prepare as follows:
   a. Soak slide in xylene substitute for 1-2 minutes to remove paraffin.
   b. Dip slide in 100% ethanol twelve times.
   c. Dip slide in 95% ethanol twelve times.
   d. Rinse gently in demineralized water and proceed with step 4.
4. Add 1 drop of BactiDrop Potassium Hydroxide (10%) and mix gently.
5. Add 1 drop of BactiDrop Calcofluor White and mix gently.
6. Stain for five minutes. Remove excess stain by rinsing in demineralized water.Cover with a clean glass coverslip and examine the specimen using a fluorescent microscope. Observe for fluorescence and typical morphology.

Microsporidia:
1. Although the most common specimen is a fresh or preserved (formalin or SAF) stool specimen, other specimens, such as tissues, duodenal aspirates, concentrated urine, sputum, CSF, nasal discharge, BAL, and conjunctiva, are appropriate. A thin specimen (10 µl) should be placed on a clean glass slide and heat fixed on a slide warmer at 60°C until dry.
2. Fix slide in methanol for 2 minutes.
3. Add 1 drop of BactiDrop Potassium Hydroxide (10%) and mix gently.
4. Add 1 drop of BactiDrop Calcofluor White and mix gently.
5. Stain for 1 minute. Rinse with demineralized water to remove excess. Cover with a clean glass coverslip and examine the specimen using a fluorescent microscope. Observe for fluorescence and typical morphology.

Pneumocystis carinii:
1. Concentrated BAL (10-25 µl) or tissue samples are the specimens of choice as decreased sensitivity is observed with induced sputum. Specimen should be placed on a clean glass slide and allowed to air dry.
2. Fix slide in methanol for 2 minutes.
3. Add 1 drop of BactiDrop Potassium Hydroxide (10%) and mix gently.
4. Add 1 drop of BactiDrop Calcofluor White and mix gently.
5. Stain for one minute. Remove excess stain by rinsing in demineralized water. Cover with a clean glass coverslip and examine the specimen using a fluorescent microscope. Observe for fluorescence and typical morphology.

INTERPRETATION

Fungal elements, Yeast -	Bright apple green fluorescence with typical morphology
Acanthamoeba cysts -	Cysts (10-25 µm) appear corrugated and double-walled with bright apple-green fluorescence and bright orange cytoplasm.
Microsporidia -	Apple-green fluorescence, intestinal micro-sporidia spores range in size from 0.9-1.5 µm to 1.2-2.0 µm, cell wall is brightened but staining is not specific.
Pneumocystis carinii -	Brilliant apple-green fluorescence, cysts are 5-8 µm in diameter and contain up to 8 crescent or pleomorphic shaped sporozoites, cell wall and double parenthesis structures inside the cysts stain intensely.
Bacteria -	Weak to no fluorescence, typical coccoid or bacillary shape

QUALITY CONTROL

All lot numbers of BactiDrop Calcofluor White have been tested using the following quality control organisms and have been found to be acceptable. Testing of control organisms should be performed in accordance with established laboratory quality control procedures. If aberrant quality control results are noted, patient results should not be reported.

CONTROL	RESULTS
Trichophyton mentagrophytes ATCC® 9533	Bright green fluorescence
Escherichia coli ATCC® 25922	Weak to no fluorescence

LIMITATIONS

1. Calcofluor white is a fluorescent brightener that aids in the detection of certain microorganisms by means of morphological delineation. Definitive identification may require additional biochemical and serological testing, or confirmation by an alternate staining technique.
2. Studies indicate that the capsule of *Cryptococcus* will not stain with calcofluor white. Alternate techniques, such as direct examination using India ink, are recommended for the detection of this organism.[4]
3. Various types of debris may fluoresce. Bacteria may also fluoresce but less brightly than fungi.
4. Both Potassium Hydroxide (10%) and Calcofluor White reagents must be added for *Pneumocystis carinii, Acanthamoeba*, and microsporidia to adequately fluoresce.
5. Brightener-induced fluorescence fades with prolonged viewing, especially in thinner sections, but fluorescence may be restored by restaining.[11]
6. If a specimen contains excessive, nonspecific debris or yeasts, further examination for microsporidia should be performed by another staining method. All positives for microsporidia should be confirmed by the Modified Trichrome stain.[9]

BIBLIOGRAPHY

1. Darken, M. 1961. Science. 133:1704-1705.
2. Hageage, G.J. and B.J. Harrington. 1984. Lab. Med. 15:109-112.
3. Monheit, J.E., D.F. Cowan, and D.G. Moore. 1984. Arch. Pathol. Lab. Med. 108:616-618.
4. Al-Doory, Y., R.J. Yankey, and M.L. Elgart. 1985. Lab. Mgment. 23:63-68.
5. Cernak, P. Methodist Hospital, Houston, TX. 1987. Data on file. Remel, Lenexa, KS.
6. Baselski, V.S. and M.K. Robison. 1989. Am. Clin. Lab. 8:36-37.
7. Milligan, T. 1992. J. Clin. Microbiol. 30:754.
8. Wilhelmus, K.R., M.S. Osato, R.L. Font, N.M. Robinson, and D.B. Jones. 1986. Arch. Opthamol. 104:1309-1312.
9. Weber, R., R.T. Bryan, D.A. Schwartz, and R.L. Owen. 1994. Clin. Microbiol. Rev. 7:426-461.
10. Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and D.W. Warnock. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore MD.

PACKAGING

BactiDrop Calcofluor White (0.75 ml/Ampule):
REF R21507 .... 50 Ampules/Pk

Symbol Legend

REF	Catalog Number
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device
LAB	For Laboratory Use
	Consult Instructions for Use (IFU)
	Temperature Limitation (Storage Temp.)
LOT	Batch Code (Lot Number)
	Use By (Expiration Date)
EC REP	Authorized European Representative
	Manufacturer

12076 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK



For technical information contact your local distributor.

remel

BactiDrop™ Calcofluor White (Deutsch)

ANWENDUNGSGEBIET
Remel BactiDrop Calcofluor White ist ein schneller, nicht spezifischer fluorochromer Farbstoff, der für eine erste qualitative mikroskopische Erkennung von pilzartigen Elementen, Hefen, *Acanthamoeba*-Zysten, Mikrosporidien und *Pneumocystis carinii* in klinischem Probenmaterial empfohlen wird.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG
1961 berichtete Darken über die Aufnahme eines Fluoreszenzaufhellers – Calcofluor White – durch aktiv wachsende Hefekulturen und höhere Pilzkulturen.[1] Hageage und Harrington beschrieben die Nutzung von Calcofluor White (CFW) für den Nachweis von Hyphen und Hefen in klinischem Probenmaterial.[2] Monheit et al. wendeten diese Färbung an gefrorenen Lungenschnitten und Schnitten weicher Gewebe zur intraoperativen Diagnose von Pilzinfektionen an.[3] In jüngster Zeit wurde Calcofluor White für die Erkennung von Pilzen in Direktpräparaten und entparaffinierten Gewebeschnitten verwendet.[4,5] Baselski und Robison beschrieben die Anwendung von Calcofluor White bei der Erkennung von *P. carinii-Zysten* in Bronchial-Lavageproben (BAL).[6] Milligan bestätigte 1992, dass BAL-Proben für die Erkennung von Infektionen nützlich seien, die durch andere opportunistische Pilze sowie *P. carinii* bei immungeschwächten Patienten hervorgerufen wurden.[7] Wilhelmus et al. wiesen die Fluoreszenz von *Acanthamoeba* keratitis in Hornhautabschabungen durch die CFW-Färbung nach.[8] Weber et al. berichteten, dass chemofluoreszente optische Aufheller, wie etwa Calcofluor White, auch Mikrosporidien-Sporen färben.[9]

PRINZIP
Calcofluor White ist ein nicht spezifisches Fluorochrom mit der Fähigkeit zur Bindung von Cellulose und Chitin. Bei Anregung mit langwelligem ultravioletten Licht grenzt diese Verbindung die Zellwände der cellulosehaltigen Organismen ab.[2] Vor der Färbung mit Calcofluor White wird Kaliumhydroxid eingesetzt, um Gewebezellen aufzulösen. Evans Blue-Farbstoff wird eingesetzt, um Hintergrundmaterial zu verringern.

REAGENZIEN (KLASSISCHE FORMEL)*
Calcofluor White (CAS 4404-43-7).. 1,0 g
Evans Blue Farbstoff (CAS 314-13-6).. 0,4 g
Entmineralisiertes Wasser (CAS 7732-18-5)............................ 1000,0 ml

*Jeweils angepasst, um die Leistungscharakteristika zu erfüllen.

VORSICHTSMAßNAHMEN
ACHTUNG! Kann Irritationen der Augen, der Haut und der Atemwege hervorrufen. Die toxikologischen Eigenschaften von diesem Material wurden nicht vollständig untersucht.

In Vitro-Diagnostikum. Nur zur Verwendung durch Fachpersonal. Zur Vermeidung mikrobiologischer Risiken sind geeignete Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Nach dem Gebrauch sind das Probenmaterial, Behälter und Kulturmedien zu sterilisieren. Die Anweisungen sind sorgfältig zu lesen und zu befolgen.

LAGERUNG
Dieses Produkt ist gebrauchsfertig. Das Produkt ist bis zur Verwendung bei 20-25°C in dem Originalbehälter aufzubewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Vor Licht schützen.

PRODUKTBEEINTRÄCHTIGUNG
Dieses Produkt darf nicht angewendet werden, falls (1) Dehydrierung auftritt, (2) Farbveränderungen eingetreten sind, (3) das Verfallsdatum überschritten wurde oder (4) andere Anzeichen einer Beeinträchtigung des Produkts erkennbar sind. Das Verfallsdatum gilt unter der Voraussetzung, dass sich das Produkt im Originalbehälter befindet und gemäß den Anleitungen aufbewahrt wird. Reste teilweise verbrauchter Ampullen sind am Ende des Arbeitstages zu vernichten.

PROBENENTNAHME, LAGERUNG UND TRANSPORT
Die Probennahme und die weitere Handhabung sind nach den empfohlenen Richtlinien durchzuführen.[10]

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND
(1) Gerät zur Sterilisierung von Impfösen, (2) Impföse oder Impfnadel, Tupfer, Sammelbehälter, (3) Inkubator, alternative Anzuchtmethoden, (4) ergänzende Kulturmedien, Blutkulturmedien, (5) Qualitätskontroll-organismen, (6) Objektträger, Deckgläschen, (7) Fluoreszenzmikroskop*, (8) BactiDrop Kaliumhydroxid (10%) (R21524), (9) Heizplatte, (10) 100% Ethanol, (11) 95% Ethanol, (12) Methanol, (13) Xylol-Ersatz.

*Für optimale Ergebnisse wird ein Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Anregungsfilter im Bereich 400 – 500 nm mit einer Spitze bei 440 nm und einem Sperrfilter von 500 – 520 nm empfohlen. Filterempfehlungen sind beim Hersteller des Fluoreszenzmikroskops für die Fluoreszenz von Calcofluor White einzuholen.

VERFAHREN
Ampulle in den mitgelieferten, wieder verwendbaren Tropfer/Ampullenöffner einsetzen. Ampullenöffner in aufrechter Position halten und leicht auf den Boden klopfen, um eventuelle Luftbläschen zu entfernen. Den Ampullenöffner mit Daumen und Zeigefinger in der Mitte umfassen, um die Ampulle zu zerdrücken. Ampulle umdrehen und die Flüssigkeit durch leichtes Drücken tropfenweise auftragen.

Pilzelemente und Hefen:
1. Probenmaterial auf einen sauberen Objektträger geben und auf einer Heizplatte bei 60°C trocknen lassen.
2. Einen Tropfen BactiDrop Kaliumhydroxid (10%) hinzufügen und vorsichtig mischen.
3. Einen Tropfen BactiDrop Calcofluor White hinzugeben und vorsichtig mischen.
4. Den Objektträger mit einem sauberen Deckgläschen abdecken und die Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Fluoreszenz und typische Morphologie sind zu untersuchen.

Acanthamoeba-Zysten:
1. Probenmaterial auf einen sauberen Objektträger geben und an der Luft trocknen lassen. Geeignetes Probenmaterial für die Untersuchung auf einem Objektträger sind Hornhautbschabungen oder Biopsien, Bindehaut oder Hornhautgeschwüre, Kontaktlinsen-Zubehör und konzentrierte Wasserproben von mindestens 100 ml. Anderes Probenmaterial kann verwendet werden, wenn die Infektion disseminiert ist.
2. Den Objektträger für 2 Minuten in Methanol fixieren.
3. Paraffinschnitte (6 µm dick) können ebenfalls verwendet werden. Probenmaterial dann wie folgt vorbereiten:
   a. Den Objektträger für 1–2 Minuten in Xylol-Ersatz geben, um das Paraffin zu entfernen.
   b. Den Objektträger zwölf-mal kurz in 100% Ethanol tauchen.
   c. Den Objektträger zwölf-mal kurz in 95% Ethanol tauchen.
   d. Den Objektträger leicht mit entmineralisiertem Wasser abspülen und mit Schritt 4 fortfahren.
4. Einen Tropfen BactiDrop Kaliumhydroxid (10%) hinzufügen und vorsichtig mischen.
5. Einen Tropfen BactiDrop Calcofluor White hinzufügen und vorsichtig mischen.
6. Fünf Minuten lang den Farbstoff einwirken lassen. Den überschüssigen Farbstoff durch Spülen mit entmineralisiertem Wasser entfernen. Den Objektträger mit einem sauberen Deckgläschen abdecken und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Fluoreszenz und typische Morphologie sind zu untersuchen.

Mikrosporidien:
1. Obwohl das häufigste Probenmaterial frische oder konservierte (Formalin oder SAF) Stuhlproben sind, kann auch anderes Probenmaterial, wie etwa Gewebe, Duodenalabsaugungen, konzentrierter Urin, Sputum, CSF, nasaler Ausfluss, BAL und Bindehaut untersucht werden. Das Probenmaterial sollte dünn (10 µl) auf einen sauberen Objektträger aufgetragen werden und auf einer Heizplatte bei 60°C bis zur Trocknung fixiert werden.
2. Den Objektträger für 2 Minuten in Methanol fixieren.
3. Einen Tropfen BactiDrop Kaliumhydroxid (10%) hinzufügen und vorsichtig mischen.
4. Einen Tropfen BactiDrop Calcofluor White hinzufügen und vorsichtig mischen.
5. Farbstoff 1 Minute einwirken lassen. Objektträger mit entmineralsiertem Wasser abspülen und mit einem sauberen Deckgläschen abdecken. Die Probe unter einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Fluoreszenz und typische Morphologie sind zu untersuchen.

Pneumocystis carinii:

1. Besonders konzentrierte BAL (10-25 µl) oder Gewebe sind als Probenmaterial geeignet. Bei induziertem Sputum wurde eine verringerte Empfindlichkeit beobachtet. Das Probenmaterial auf einen sauberen Objektträger auftragen und an der Luft trocknen lassen.
2. Den Objektträger für 2 Minuten in Methanol fixieren.
3. Einen Tropfen BactiDrop Kaliumhydroxid (10%) hinzufügen und vorsichtig mischen.
4. Einen Tropfen BactiDrop Calcofluor White hinzufügen und vorsichtig mischen.
5. Farbstoff 1 Minute einwirken lassen. Objektträger mit entmineralisiertem Wasser abspülen und mit einem sauberen Deckgläschen abdecken. Die Probe unter einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Fluoreszenz und typische Morphologie sind zu untersuchen.

INTERPRETATION

Pilzelemente und Hefen:	Helle, apfelgrüne Fluoreszenz mit typischer Morphologie
Acanthamoeba-Zysten:	Zysten (10-25 µm) erscheinen gewellt und doppelwandig in heller, apfelgrüner Fluoreszenz mit hell-orangefarbenem Cytoplasma.
Mikrosporidien:	Apfelgrüne Fluoreszenz; Darm-Mikrosporidien haben eine Größe von 0,9-1,5 µm bis 1,2-2,0 µm. Die Zellwand ist erhellt, aber die Färbung ist nicht spezifisch.
Pneumocystis carinii:	Leuchtend apfelgrüne Fluoreszenz; Zysten haben einen Durchmesser von 5-8 µm und beinhalten bis zu 8 halbmondförmige oder pleomorphe Sporozoiten; die Zellwand und die intrazystischen Körperchen nehmen eine intensive Färbung an.
Bakterien:	Schwache bis keine Fluoreszenz; typischerweise kokkoide oder bazillenartige Form

QUALITÄTSKONTROLLE

Alle Chargen von BactiDrop Calcofluor White wurden mithilfe der folgenden Qualitätskontrollorganismen überprüft. Die Kontrollorganismen sollten entsprechend den üblichen Qualitätskontrollverfahren für Laboratorien getestet werden. Falls die Qualitätskontrollergebnisse abweichen, sollten die Patientenergebnisse nicht angegeben werden.

KONTROLLE	ERGEBNISSE
Trichophyton mentagrophytes ATCC® 9533	Hellgrüne Fluoreszenz
Escherichia coli ATCC® 25922	Schwache bis keine Fluoreszenz

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Calcofluor White ist ein Fluoreszenzaufheller, der die Erkennung bestimmter Mikroorganismen durch morphologische Abgrenzung ermöglicht. Für eine endgültige Identifizierung können weitere biochemische und serologische Tests oder die Bestätigung durch eine andere Färbemethode erforderlich sein.
2. Studien weisen darauf hin, dass sich die Kapsel von *Cryptococcus* durch Calcofluor White nicht anfärben lässt. Für die Erkennung dieses Organismuses sind andere Methoden, wie etwa eine direkte Untersuchung mit indischer Tusche, erforderlich.[4]
3. Einige Zelltrümmerbestandteile können fluoreszieren. Darüber hinaus können auch Bakterien fluoreszieren-jedoch weniger hell als Pilze.
4. Damit *Pneumocystis carinii, Acanthamoeba* und Mikrosporidien ausreichend fluoreszieren, müssen sowohl Kaliumhydroxid- (10%) als auch Calcofluor White-Reagenzien hinzugefügt werden.
5. Aufhellerinduzierte Fluoreszenz verringert sich nach längerer Betrachtung, insbesondere in dünneren Schnitten. Die Fluoreszenz kann durch erneutes Färben wieder hergestellt werden.[11]
6. Wenn eine Probe übermäßig viele Zelltrümmer oder Hefen enthält, sollte eine weitere Untersuchung auf Mikrosporidien durch eine andere Färbemethode erfolgen. Alle positiven Untersuchungen auf Mikrosporidien sollten durch eine modifizierte Trichrom-Färbung bestätigt werden.[9]

BIBLIOGRAPHIE

1. Darken, M. 1961. Science. 133:1704-1705.
2. Hageage, G.J. und B.J. Harrington. 1984. Lab. Med. 15:109-112.
3. Monheit, J.E., D.F. Cowan und D.G. Moore. 1984. Arch. Pathol. Lab. Med. 108:616-618.
4. Al-Doory, Y., R.J. Yankey und M.L. Elgart. 1985. Lab. Mgment. 23:63-68.
5. Cernak, P. Methodist Hospital, Houston, TX. 1987. Daten in Datei. Remel, Lenexa, KS.
6. Baselski, V.S. und M.K. Robison. 1989. Am. Clin. Lab. 8:36-37.
7. Milligan, T. 1992. J. Clin. Microbiol. 30:754.
8. Wilhelmus, K.R., M.S. Osato, R.L. Font, N.M. Robinson und D.B. Jones. 1986. Arch. Opthamol. 104:1309-1312.
9. Weber, R., R.T. Bryan, D.A. Schwartz und R.L. Owen. 1994. Clin. Microbiol. Rev. 7:426-461.
10. Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and D.W. Warnock. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th ed. Williams und Wilkins, Baltimore MD.

VERPACKUNG

BactiDrop Calcofluor White (0,75 ml/Ampulle):
REF R21507 .... 50 Ampullen/Pk

Verwendete Symbole

REF	Katalognummer
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LAB	Für Laborgebrauch
	Gebrauchsanweisung beachten
	Temperaturbeschränkungen (Lagerungstemp.)
LOT	Chargencode (Losnummer)
	Verfallsdatum
EC REP	Autorisierte Vertretung für U-Länder
	Hersteller

12076 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK



remel

BactiDrop™ Calcofluor Blanc (Français)

INDICATION

Le colorant Calcofluor Blanc BactiDrop de Remel est un colorant fluorochrome, rapide et non spécifique, recommandé dans le cadre des procédures qualitatives de détection initiale d'éléments fongiques, de levures, de kératites à *Acanthamoeba*, de microsporidies, et de *Pneumocystis carinii* dans des échantillons cliniques.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

En 1961, Darken a signalé la fixation d'un agent de blanchiment fluorescent, le calcofluor blanc, par les cultures en pleine croissance de levures et de champignons.[1] Hageage et Harrington ont décrit l'utilisation du calcofluor blanc pour démontrer la présence d'hyphes et de levures dans des prélèvements cliniques.[2] Monheit et al. ont appliqué ce colorant à des coupes congelées de poumon et de tissus mous pour le diagnostic peropératoire d'infections fongiques.[3] Plus récemment, le calcofluor blanc a été utilisé dans la détection des champignons dans des préparations directes et dans des coupes tissulaires déparaffinées.[4,5] Baselski et Robison ont signalé l'utilisation du calcofluor blanc dans la détection des kystes de *P. carinii* dans les échantillons de lavage broncho-alévolaire (LBA).[6] Milligan a confirmé ces résultats en 1992, en établissant que les échantillons de LBA sont utiles pour détecter des infections dues à d'autres champignons opportunistes, ainsi qu'à *P. carinii* chez les patients immunodéprimés.[7] Wilhelmus et al. ont mis en évidence la fluorescence des kératites à *Acanthamoeba* dans les grattages cornéens colorés au calcofluor blanc.[8] Weber et al. ont montré que les agents de blanchiment optique chimiofluorescent, comme le calcofluor blanc, colorent aussi les spores de microsporidies.[9]

PRINCIPE

Le calcofluor blanc est fluorochrome non spécifique ayant la capacité de se fixer sur la cellulose et la chitine. Suite à une excitation avec de la lumière ultraviolette, ce composé sert à délimiter les parois cellulaires des microorganismes contenant de la cellulose.[2] Avant la coloration au calcofluor blanc, de l'hydroxyde de potassium est utilisé comme agent clarifiant, car il dissout les cellules tissulaires. Du colorant bleu Evans est incorporé au colorant afin de diminuer le bruit de fond.

RÉACTIFS (FORMULE CLASSIQUE)*

Calcofluor Blanc (CAS 4404-43-7)	1,0	g
Colorant bleu Evans (CAS 314-13-6)	0,4	g
Eau déminéralisée (CAS 7732-18-5)	1000,0	ml

*Avec ajustements éventuels pour satisfaire aux normes de performance.

PRÉCAUTIONS

ATTENTION ! Risque d'irritation des yeux, de la peau et des voies respiratoires. Ses propriétés toxicologiques n'ont pas été pleinement évaluées.

Ce produit exclusivement destiné à un usage diagnostique *in vitro* ne doit être utilisé que par des personnes dûment formées. Toutes les précautions contre les risques microbiologiques doivent être prises et il est indispensable de bien stériliser les prélèvements, les récipients et les milieux après usage. Toutes les instructions doivent être lues attentivement et soigneusement suivies.

STOCKAGE

Le produit est prêt à l'emploi et aucune préparation supplémentaire n'est nécessaire. Le conserver dans son conditionnement d'origine entre 20 et 25°C, jusqu'à son utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Ne pas exposer à la lumière.

DÉTÉRIORATION DU PRODUIT

Le produit ne doit pas être utilisé si (1) vous observez une déshydratation, (2) la couleur a changé, (3) la date de péremption est dépassée ou (4) d'autres signes de détérioration sont présents. La date de péremption s'applique au produit à condition que le récipient soit intact et qu'il soit stocké conformément aux instructions. À la fin de la journée de travail, le produit restant éventuellement dans l'ampoule doit être jeté.

RECUEIL, STOCKAGE, TRANSPORT DES PRÉLÈVEMENTS

Les prélèvements doivent être recueillis et manipulés conformément aux recommandations en usage dans la profession.[10]

MATÉRIEL REQUIS NON FOURNI

(1) Dispositif de stérilisation, (2) oese ou aiguille d'inoculation, écouvillons, récipients de prélèvement, (3) incubateurs, autres systèmes environnementaux, (4) milieux supplémentaires, milieux pour hémoculture, (5) microorganismes de contrôle de qualité, (6) lames de verre, lamelles couvre-objets, (7) microscope à fluorescence*, (8) Hydroxyde de potassium (10%) BactiDrop (R21524), (9) chauffe-lame, (10) éthanol à 100%, (11) éthanol à 95%, (12) méthanol, (13) produit de remplacement du xylène.

*Il est recommandé d'utiliser un microscope à fluorescence avec un filtre d'excitation de 400-500 nm avec un pic de 440 nm et un filtre interférentiel de 500-520 nm pour obtenir des résultats optimaux. Consulter le fabricant du microscope à fluorescence pour qu'il vous recommande les filtres appropriés à la fluorescence du calcofluor blanc.

PROCÉDURE

Placer le compte-gouttes dans le broyeur d'ampoules réutilisable fourni. Tenir bien droit l'ensemble compte-gouttes/broyeur et tapoter légèrement le bas pour en déloger les bulles qui s'y sont éventuellement formées. Saisir l'ensemble compte-gouttes/broyeur par le milieu entre le pouce et l'index et, la pointe dirigée vers l'extérieur, appuyer doucement pour écraser l'ampoule. Retourner le compte-gouttes et appuyer sans excès pour déposer les gouttes une à une.

Éléments fongiques et levures:

1. Placer un prélèvement sur une lame de verre propre et laisser sécher sur le chauffe-lame à 60°C.
2. Ajouter 1 goutte d'Hydroxyde de Potassium (10%) BactiDrop, puis mélanger doucement.
3. Ajouter 1 goutte de Calcofluor Blanc BactiDrop, puis mélanger doucement.
4. Couvrir la lame avec une lamelle de verre propre et observer le prélèvement avec un microscope à fluorescence. Rechercher la fluorescence et la morphologie caractéristique.

Kystes d' *Acanthamoeba*:

1. Placer le prélèvement sur une lame de verre propre et laisser sécher à l'air libre. Pour préparer la lame, vous pouvez utiliser les prélèvements suivants : biopsie ou grattage cornéen, ulcération de la cornée ou de la conjonctive, accessoires des lentilles de contact et échantillons liquides concentrés d'au moins 100 ml. Il est possible d'utiliser d'autres types de prélèvements si l'infection est disséminée.
2. Fixer la lame dans du méthanol pendant 2 minutes.
3. Il est aussi possible d'utiliser des coupes paraffinées (grosseur: 6 µm). Préparer comme suit:
   a. Tremper la lame dans le produit de substitution du xylène pendant 1-2 minutes pour enlever la paraffine.
   b. Plonger 12 fois la lame dans de l'éthanol à 100%.
   c. Plonger 12 fois la lame dans de l'éthanol à 95%.
   d. Rincer avec précaution dans de l'eau déminéralisée, puis passer à l'étape 4.
4. Ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (10%) BactiDrop, puis mélanger doucement.
5. Ajouter 1 goutte de Calcofluor Blanc BactiDrop, puis mélanger doucement.
6. Laisser colorer pendant 5 minutes. Rincer avec de l'eau déminéralisée pour éliminer le colorant en excès. Couvrir la lame avec une lamelle de verre propre et observer le prélèvement avec un microscope à fluorescence. Rechercher la fluorescence et la morphologie caractéristique.

Microsporidies:

1. Bien que l'échantillon de selles fraîches ou conservées (formol ou SAF) soit le prélèvement le plus courrant, il est possible d'utiliser d'autres types de prélèvement comme des tissus, des aspirats duodénaux, de l'urine concentrée, des crachats, du LCR, des sécrétions nasales, du LBA et de la conjonctive. Un prélèvement fin (10 µl) doit être placé sur une lame de verre propre puis fixé par la chaleur d'un chauffe-lame à 60°C jusqu'à ce qu'il soit sec.
2. Fixer la lame dans du méthanol pendant 2 minutes.
3. Ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (10%) BactiDrop, puis mélanger doucement.
4. Ajouter 1 goutte de Calcofluor Blanc BactiDrop, puis mélanger doucement.
5. Laisser colorer pendant 1 minute. Rincer avec de l'eau déminéralisée pour éliminer le colorant en excès. Couvrir la lame avec une lamelle de verre propre et observer le prélèvement avec un microscope à fluorescence. Rechercher la fluorescence et la morphologie caractéristique.

Pneumocystis carinii:

1. Il est recommandé d'utiliser du LBA concentré (10-25 µl) ou des échantillons de tissu car la sensibilité est moindre pour les expectorations induites. Placer le prélèvement sur une lame de verre propre et laisser sécher à l'air libre.
2. Fixer la lame dans du méthanol pendant 2 minutes.
3. Ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (10%) BactiDrop, puis mélanger doucement.
4. Ajouter 1 goutte de Calcofluor Blanc BactiDrop, puis mélanger doucement.
5. Laisser colorer pendant 1 minute. Rincer avec de l'eau déminéralisée pour éliminer le colorant en excès. Couvrir la lame avec une lamelle de verre propre et observer le prélèvement avec un microscope à fluorescence. Rechercher la fluorescence et la morphologie caractéristique.

INTERPRÉTATION DU TEST

Éléments fongiques, levures -	Fluorescence de couleur vert pomme vif avec morphologie caractéristique
Kystes d' *Acanthamoeba* -	Vous pouvez voir des kystes (10-25 µm), plissés et à paroi double, avec une fluorescence vert pomme vif et un cytoplasme orange vif.
Microsporidies -	Fluorescence vert pomme; la taille des spores de microsporidies intestinales va de 0,9-1,5 µm à 1,2-2,0 µm, la paroi cellulaire est avivée mais la coloration n'est pas spécifique.
Pneumocystis carinii -	Fluorescence vert pomme brillant; les kystes ont un diamètre de 5-8 µm et contiennent jusqu'à 8 sporozoïtes en forme de croissant ou pléomorphe; la paroi cellulaire et les structures en double parenthèses à l'intérieur des kystes sont intensément colorées.
Bactéries -	Faible fluorescence ou absence de fluorescence; forme caractéristique coccoïde ou bacillaire

CONTRÔLE QUALITÉ

Tous les numéros de lots de Calcofluor Blanc BactiDrop ont été testés avec les microorganismes de contrôle de qualité suivants et reconnus acceptables. Les tests de microorganismes de contrôle doivent satisfaire aux critères établis pour les procédures de contrôle qualité en laboratoire. En cas de résultats de contrôle qualité aberrants, ne pas signaler les résultats du patient.

CONTRÔLE	RÉSULTATS
Trichophyton mentagrophytes ATCC® 9533	Fluorescence: vert vif
Escherichia coli ATCC® 25922	Fluorescence: faible ou absente

LIMITATIONS

1. Le calcofluor blanc est un agent de blanchiment fluorescent qui aide à détecter certains microorganismes moyennant délimitation morphologique. D'autres analyses biochimiques et sérologiques ou une confirmation par une autre technique de coloration peuvent être nécessaires pour avoir une identification définitive.
2. Des études indiquent que la capsule de *Cryptococcus* ne se colore pas avec le calcofluor blanc. Il est recommandé d'utiliser des techniques alternatives, comme l'observation directe en utilisant de l'encre de Chine, pour détecter ce microorganisme.[4]
3. Il est possible que plusieurs types de débris soient fluorescents. Il est aussi possible que les bactéries présentent une fluorescence, mais elle est moins vive que celle des champignons.
4. Il est nécessaire d'ajouter les deux réactifs, l'hydroxyde de potassium (10%) et le calcofluor blanc, afin de développer correctement la fluorescence pour la détection de *Pneumocystis carinii*, *Acanthamoeba* et des microsporidies.
5. La fluorescence induite par l'agent de blanchiment s'estompe après une observation prolongée, en particulier dans le cas de coupes les plus fines, mais il est possible de la rétablir en colorant à nouveau le prélèvement.
6. Si un prélèvement contient trop de débris non spécifiques ou de levures, il est nécessaire de réaliser une autre recherche de microsporidies avec une méthode de coloration alternative. Tous les résultats indiquant la présence de microsporidies doivent être confirmés par une coloration trichrome modifié.[9]

BIBLIOGRAPHIE

1. Darken, M. 1961. Science. 133:1704-1705.
2. Hageage, G.J. and B.J. Harrington. 1984. Lab. Med. 15:109-112.
3. Monheit, J.E., D.F. Cowan, and D.G. Moore. 1984. Arch. Pathol. Lab. Med. 108:616-618.
4. Al-Doory, Y., R.J. Yankey, and M.L. Elgart. 1985. Lab. Mgment. 23:63-68.
5. Cernak, P. Methodist Hospital, Houston, TX. 1987. Data on file. Remel, Lenexa, KS.
6. Baselski, V.S. and M.K. Robison. 1989. Am. Clin. Lab. 8:36-37.
7. Milligan, T. 1992. J. Clin. Microbiol. 30:754.
8. Wilhelmus, K.R., M.S. Osato, R.L. Font, N.M. Robinson, and D.B. Jones. 1986. Arch. Opthamol. 104:1309-1312.
9. Weber, R., R.T. Bryan, D.A. Schwartz, and R.L. Owen. 1994. Clin. Microbiol. Rev. 7:426-461.
10. Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and D.W. Warnock. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore MD.

CONDITIONNEMENT

BactiDrop Calcofluor Blanc (0,75 ml/ampoule):
REF R21507 .... 50 ampoules/boîte

Légende des Symboles

REF	Numéro de référence
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
LAB	Pour l 'usage de laboratoire
	Lire les instructions avant utilisation (IFU = mode d'emploi)
	Limites de température (stockage)
LOT	Code de lot (numéro)
	À utiliser avant le (date de péremption)
EC REP	Représentant autorisé pour l'UE
	Fabricant

12076 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK



Pour tout support technique, contacter le distributeur local.

remel

BactiDrop™ Bianco Calcofluoro (Italiano)

USO PREVISTO
Il Bianco Calcofluoro BactiDrop di Remel è un colorante fluorocromo aspecifico ad azione rapida consigliato per l'uso in procedure qualitative per l'iniziale rilevamento microscopico di funghi, lieviti, cisti da *Acantameba*, microsporidia e *Pneumocystis carinii* in campioni clinici.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO
Nel 1961 Darken documentò l'assorbimento di una sostanza per brillantaggio fluorescente, il bianco calcofluoro, facendo crescere in modo attivo colture di lievito e funghi superiori.[1] Hageage e Harrington descrissero l'uso del bianco calcofluoro (CFW) per dimostrare la presenza di ife e lieviti in campioni clinici.[2] Monheit et al. applicarono questo colorante su sezioni congelate di polmone e tessuti molli allo scopo di fornire una diagnosi intra-operatoria di infezione fungina.[3] Più recentemente il bianco calcofluoro è stato utilizzato per rilevare la presenza di funghi in preparazioni dirette e in sezioni di tessuto deparaffinizzato.[4,5] Baselski e Robison documentarono l'uso del bianco calcofluoro nel rilevamento di cisti da *P. carinii* in campioni ottenuti con lavaggio broncoalveolare (BAL).[6] Milligan confermò queste scoperte nel 1992, documentando l'utilità dei campioni BAL nel rilevamento di infezioni causate da altri funghi opportunistici nonché dal *P. carinii* in pazienti immunocompromessi.[7] Wilhelmus et al. dimostrarono la fluorescenza dell'*Acanthamoeba* keratitis in raschiamenti corneali mediante colorazione con bianco calcofluoro.[8] Weber et al. dimostrarono che sostanze per brillantaggio ottico chemiofluorescenti, come il bianco calcofluoro, colorano anche le spore dei microsporidi.[9]

PRINCIPIO
Il bianco calcofluoro è un fluorocromo aspecifico in grado di legarsi alla cellulosa e alla chitina. Quando eccitato con luce ultravioletta ad onda lunga, questo composto è in grado di delineare le pareti cellulari di organismi contenenti cellulosa.[2] Prima della colorazione con bianco calcofluoro, si utilizza idrossido di potassio che funge da agente di fissaggio dissolvendo le cellule tissutali. Alla colorazione viene aggiunto il colorante Blu Evans per ridurre al minimo il materiale di fondo.

REAGENTI (FORMULA CLASSICA)*
Bianco Calcofluoro (CAS 4404-43-7)... 1,0 g
Colorante Blu Evans (CAS 314-13-6) .... 0,4 g
Acqua Demineralizzata (CAS 7732-18-5) .... 1000,0 ml

*La formulazione è regolata in base ai criteri di esecuzione richiesti.

PRECAUZIONI
ATTENZIONE! Può causare irritazione a occhi, pelle e alle vie respiratorie. Non sono state condotte analisi approfondite sulle proprietà tossicologiche di questa sostanza.

Il prodotto è indicato per l'uso diagnostico in vitro e deve essere utilizzato solo da personale competente ed esperto. Si raccomanda di adottare le dovute precauzioni contro eventuali rischi microbiologici sterilizzando opportunamente dopo l'uso campioni, contenitori e strumenti. Leggere con attenzione le istruzioni contenute in questo documento e attenervisi scrupolosamente.

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE
Questo prodotto è pronto per l'uso e non necessita di ulteriore preparazione. Conservare il prodotto nel suo contenitore originale ad una temperatura di 20-25°C fino al momento dell'utilizzo. Non congelare né surriscaldare. Proteggere il prodotto dalla luce.

DETERIORAMENTO DEL PRODOTTO
Non utilizzare il prodotto (1) in presenza di segni evidenti di disidratazione, (2) se ha cambiato colore, (3) oltre la data di scadenza o (4) in presenza di altri segni di deterioramento. La data di scadenza del prodotto è considerata valida se il contenitore è integro e se il prodotto viene conservato secondo le indicazioni. Gettare la parte restante della fiala parzialmente utilizzata alla fine del giorno di lavoro.

RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI
Prelevare e trattare i campioni attenendosi alle linee guida raccomandate.[10]

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO
(1) Dispositivo di sterilizzazione per anse, (2) ansa o ago per inoculo, tamponi, contenitori di raccolta, (3) termostato, sistemi per la formazione di atmosfere modificate, (4) terreni di coltura supplementari, (5) organismi di controllo qualità, (6) vetrini, coprivetrini, (7) microscopio in fluorescenza,* (8) Idrossido di Potassio BactiDrop (10%) (R21524), (9) riscaldatore per vetrini, (10) etanolo 100%, (11) etanolo 95%, (12) metanolo, (13) sostituto dello xilene.

*Per ottenere risultati ottimali si consiglia l'utilizzo di un microscopio in fluorescenza con un filtro compreso tra 400-500 nm dotato di un picco di 440 nm e un filtro barriera di 500-520 nm. Per raccomandazioni sull'uso di un filtro idoneo alla fluorescenza del bianco calcofluoro rivolgersi al produttore del microscopio.

PROCEDIMENTO
Posizionare il contagocce nello strumento aprifiale montato e riutilizzabile fornito in dotazione. Tenere il contagocce/lo strumento aprifiale in posizione verticale e picchiettare leggermente la parte inferiore per eliminare eventuali bolle. Afferrare la parte centrale del contagocce/dello strumento aprifiale con il pollice e l'indice e, con la punta orientata verso l'esterno, premere delicatamente per aprire la fiala. Capovolgere il contagocce e premere leggermente per una distribuzione goccia a goccia.

Funghi e lieviti:
1. Sistemare il campione su un vetrino e lasciarlo asciugare sul riscaldatore per vetrini ad una temperatura di 60°C.
2. Aggiungere 1 goccia di Idrossido di Potassio BactiDrop (10%) e mischiare delicatamente.
3. Aggiungere 1 goccia di Bianco Calcofluoro BactiDrop e mischiare delicatamente.
4. Coprire il vetrino con un coprivetrino pulito ed analizzare il campione con un microscopio in fluorescenza. Osservarne la fluorescenza e la tipica morfologia.

Cisti da *Acantameba*:
1. Sistemare il campione su un vetrino pulito e lasciarlo asciugare all'aria. I campioni più indicati per la preparazione su vetrini sono i campioni di raschiamenti o biopsie corneali, campioni di congiuntiva o ulcera corneale, campioni di accessori per lenti a contatto e campioni di acqua concentrata di almeno 100 ml. Se l'infezione è disseminata è possibile utilizzare anche altri campioni.
2. Fissare il vetrino in metanolo per 2 minuti.
3. È possibile utilizzare anche sezioni paraffinate (spessore di 6 µm). Per la preparazione procedere come segue:
   a. Lasciare immerso il vetrino nel sostituto dello xilene per 1-2 minuti in modo da rimuovere la paraffina.
   b. Immergere dodici volte il vetrino in etanolo 100%.
   c. Immergere dodici volte il vetrino in etanolo 95%.
   d. Sciacquare delicatamente in acqua demineralizzata e passare al punto 4.
4. Aggiungere 1 goccia di Idrossido di Potassio BactiDrop (10%) e miscelare delicatamente.
5. Aggiungere 1 goccia di Bianco Calcofluoro BactiDrop e miscelare delicatamente.
6. Lasciare agire il colorante per cinque minuti. Rimuovere il colorante in eccesso sciacquando il campione in acqua demineralizzata. Coprirlo con un coprivetrino pulito ed esaminare il campione utilizzando un microscopio in fluorescenza. Osservarne la fluorescenza e la tipica morfologia.

Microsporidia:
1. Sebbene il campione più indicato sia un campione di feci fresche o conservate (in formalina o SAF), possono essere utilizzati anche altri campioni quali tessuti, aspirati duodenali, urina concentrata, espettorato, fluido cerebrospinale, BAL e congiuntiva. Sistemare un campione (10 µl) su un vetrino pulito e fissarlo mediante calore su un riscaldatore per vetrini a 60oC finché asciutto.
2. Fissare il vetrino in metanolo per 2 minuti.
3. Aggiungere 1 goccia di Idrossido di Potassio BactiDrop (10%) e miscelare delicatamente.
4. Aggiungere1 goccia di Bianco Calcofluoro BactiDrop e miscelare delicatamente.
5. Lasciare agire il colorante per 1 minuto. Sciacquare con acqua demineralizzata per rimuovere il colorante in eccesso. Coprire con un coprivetrino pulito ed esaminare il campione utilizzando un microscopio in fluorescenza. Osservarne la fluorescenza e la tipica morfologia.

Pneumocystis carinii:

1. I campioni più indicati sono i campioni BAL concentrati (10-25 µl) o campioni tissutali in quanto nel caso dell'espettorato indotto si è riscontrata una ridotta sensibilità. Sistemare i campioni su un vetrino pulito e lasciarli asciugare all'aria.
2. Fissare il vetrino in metanolo per 2 minuti.
3. Aggiungere 1 goccia di Idrossido di Potassio BactiDrop (10%) e miscelare delicatamente.
4. Aggiungere 1 goccia di Bianco Calcofluoro BactiDrop e miscelare delicatamente.
5. Lasciare agire il colorante per un minuto. Rimuovere il colorante in eccesso sciacquando il campione con acqua demineralizzata. Coprire con un coprivetrino pulito ed esaminare il campione utilizzando un microscopio in fluorescenza. Osservarne la fluorescenza e la tipica morfologia.

INTERPRETAZIONE DEL TEST

Funghi, Lieviti -	Fluorescenza di color verde mela brillante con tipica morfologia
Cisti da *Acantameba* -	Le cisti (10-25 µm) appaiono corrugate e con una doppia parete e presentano una fluorescenza di color verde mela acceso e un citoplasma di color arancione vivo.
Microsporidia -	Fluorescenza di color verde mela; le dimensioni delle spore dei microsporidi intestinali variano da 0,9-1,5 µm a 1,2-2,0 µm, la parete cellulare è luminosa ma la colorazione è aspecifica.
Pneumocystis carinii -	Fluorescenza di colore verde mela acceso, le cisti presentano un diametro di 5-8 µm e contengono fino a 8 sporozoiti di forma a mezzaluna o pleomorfa; la parete cellulare e le strutture a doppia parentesi all'interno delle cisti si colorano intensamente.
Batteri -	Inclini a nessuna fluorescenza; tipica forma coccoide o bacillare

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni lotto di Bianco Calcofluoro BactiDrop è stato testato utilizzando i microrganismi per il controllo di qualità di seguito indicati ottenendo risultati ritenuti soddisfacenti. I test sugli organismi di controllo qualità devono essere eseguiti conformemente alle procedure di controllo qualità definite dal laboratorio. Se i test di controllo qualità forniscono risultati aberranti, i risultati ottenuti con i campioni in esame non devono essere refertati.

CONTROLLO	RISULTATO
Trichophyton mentagrophytes ATCC® 9533	Fluorescenza di color verde acceso
Escherichia coli ATCC® 25922	Inclini a nessuna fluorescenza

LIMITAZIONI

1. Il bianco calcofluoro è una sostanza per brillantaggio fluorescente che facilita il rilevamento di determinati microrganismi mediante delineamento morfologico. L'identificazione definitiva può richiedere test biochimici e sierologici supplementari oppure la conferma mediante una tecnica di colorazione alternativa.
2. Alcuni studi indicano che la capsula del *criptococco* non si colora con il bianco calcofluoro. Per il rilevamento di questo microrganismo si consiglia l'impiego di tecniche alternative quali l'esame diretto con inchiostro d'India.[4]
3. Vari tipi di residui sono sensibili alla fluorescenza. Anche i batteri possono mostrare una fluorescenza ma meno luminosa rispetto a quella dei funghi.
4. È necessario aggiungere sia l'idrossido di potassio (10%) che il bianco calcofluoro affinché i microrganismi *Pneumocystis carinii, Acanthamoeba* e microsporidia mostrino un'adeguata fluorescenza.
5. La fluorescenza indotta da una sostanza per brillantaggio si attenua in caso di visualizzazione prolungata, specialmente se si analizzano sezioni sottili, ma è possibile ripristinarla mediante ricolorazione.[11]
6. Se un campione contiene residui o lieviti aspecifici in quantità eccessiva, è necessario eseguire ulteriori esami specifici per la microsporidia utilizzando un altro metodo di colorazione. Tutti gli esami che risultano positivi alla microsporidia devono essere verificati mediante colorazione tricromica modificata.[9]

BIBLIOGRAFIA

1. Darken, M. 1961. Science. 133:1704-1705.
2. Hageage, G.J. and B.J. Harrington. 1984. Lab. Med. 15:109-112.
3. Monheit, J.E., D.F. Cowan, and D.G. Moore. 1984. Arch. Pathol. Lab. Med. 108:616-618.
4. Al-Doory, Y., R.J. Yankey, and M.L. Elgart. 1985. Lab. Mgment. 23:63-68.
5. Cernak, P. Methodist Hospital, Houston, TX. 1987. Data on file. Remel, Lenexa, KS.
6. Baselski, V.S. and M.K. Robison. 1989. Am. Clin. Lab. 8:36-37.
7. Milligan, T. 1992. J. Clin. Microbiol. 30:754.
8. Wilhelmus, K.R., M.S. Osato, R.L. Font, N.M. Robinson, and D.B. Jones. 1986. Arch. Opthamol. 104:1309-1312.
9. Weber, R., R.T. Bryan, D.A. Schwartz, and R.L. Owen. 1994. Clin. Microbiol. Rev. 7:426-461.
10. Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and D.W. Warnock. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore MD.

CONFEZIONE

BactiDrop Bianco Calcofluoro (0,75 ml/fiala):
REF R21507..50 fiale/confezione

Spiegazioni dei Simboli

REF	Numero di codice
IVD	Dispositivo medico per uso diagnostico *in vitro*
LAB	Per uso del laboratorio
	Consultare le istruzioni per l'uso (IFU)
	Limitazioni per la temperatura (Temp. di conservazione)
LOT	Codice lotto (Numero di lotto)
	Da utilizzare entro (Data di scadenza)
EC REP	Rappresentante autorizzato per l'Europa
	Fabbricante

12076 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK



Per l'assistenza tecnica, rivolgersi al distributore di zona.

CAS (Numero del registro del Chemical Abstract Service)

remel

BactiDrop™ Blanco de Calcoflúor(Español)

USO PREVISTO
Remel BactiDrop Blanco de Calcoflúor es un fluorocromo inespecífico rápido recomendado para procedimientos cualitativos de detección microscópica inicial de elementos fúngicos, levaduras, quistes de *Acanthamoeba*, microsporidios y *Pneumocystis carinii* en muestras clínicas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
En 1961, Darken publicó la captación de un iluminador fluorescente, el blanco de calcoflúor, por cultivos de crecimiento activo de levaduras y hongos superiores.[1] Hageage y Harrington describieron el uso de blanco de calcoflúor (CFW) para demostrar la presencia de hifas y levaduras en muestras clínicas.[2] Monheit et al. aplicaron esta tinción a secciones congeladas de pulmón y tejidos blandos para el diagnóstico intraoperatorio de la infección fúngica.[3] Más recientemente, se ha utilizado el blanco de calcoflúor en la detección de hongos en preparaciones directas y en cortes de tejido desaparafinizados.[4,5] Baselski y Robison publicaron el uso de blanco de calcoflúor en la detección de quistes de *P. carinii* en muestras de lavado broncoalveolar (LBA).[6] Milligan confirmó estos resultados en 1992, informando de muestras de LBA útiles para la detección de infecciones causadas por otros hongos oportunistas, así como *P. carinii* en pacientes inmunodeprimidos.[7] Wilhelmus et al. desmotraron la fluorescencia de *Acanthamoeba* en queratitis en raspaduras de la cornea mediante tinción con CFW.[8] Weber et al. informaron que iluminadores para quimiofluorescencia óptica, como el blanco de calcoflúor, también tiñen las esporas de microsporidios.[9]

PRINCIPIO
El blanco de calcoflúor es un fluorocromo inespecífico con capacidad para unirse a la celulosa y a la quitina. Tras la excitación con luz de longitud de onda ultravioleta, este compuesto actúa delineando las paredes celulares de los microorganismos que contienen celulosa.[2] Antes de la tinción con blanco de calcoflúor, se utiliza hidróxido potásico para que actúe como limpiador disolviendo las células de los tejidos. Se incorpora el colorante azul de Evans en la tinción para reducir al mínimo el material de fondo.

REACTIVOS (FÓRMULA CLÁSICA)*
Blanco de Calcoflúor (CAS 4404-43-7) .... 1,0 g
Colorante Azul Evans (CAS 314-13-6).. 0,4 g
Agua Desmineralizada (CAS 7732-18-5) ....1000,0 ml

*Ajustado según necesidad para adaptarse a los patrones de rendimiento.

PRECAUCIONES
ADVERTENCIA: Puede provocar irritación ocular, cutánea y de las vías respiratorias. No se han estudiado por completo las propiedades toxicológicas de este material.

Es un producto para diagnóstico *in vitro* únicamente y debe ser utilizado por personas adecuadamente preparadas. Deben tomarse precauciones contra los peligros de riesgos microbiológicos mediante la esterilización adecuada de las muestras, los envases y los medios después de su uso. Hay que leer las instrucciones y seguirlas meticulosamente.

ALMACENAMIENTO
Este producto está listo para su uso y no se necestia más preparación. Guardar el producto en su envase original a 20-25ºC hasta que se use. No congelar ni sobrecalentar. Protegerlo de la luz.

DETERIORO DEL PRODUCTO
Este producto no debe utilizarse si (1) hay pruebas de deshidratación, (2) el color ha cambiado, (3) la fecha de caducidad ha pasado ó (4) hay otros signos de deterioro. La fecha de caducidad se refiere a este producto cuando está en su envase intacto y se almacena según las instrucciones. Desechar la porción restante de la ampolla parcialmente utilizada al final del día de trabajo.

RECOGIDA, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS
Las muestras deben recogerse y manipularse siguiendo las pautas recomendadas.[10]

MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO
(1) Esterilizador del asa, (2) Asa o aguja de inoculación, torundas, envases de recogida, (3) Incubadores, sistemas ambientales alternativos, (4) Medios de cultivo complementarios, medios para cultivo de sangre (5) Microorganismos para control de calidad, (6) Portaobjetos y cubreobjetos, (7) Microscopio de fluorescencia*, (8) BactiDrop Hidróxido de Potasio (10%) (R21524), (9) Calentador de portaobjetos (10) Etanol al 100%, (11) Etanol al 95%, (12) Metanol, (13) Sustituto de xileno.

*Para obtener resultados óptimos se recomienda un microscopio de fluorescencia con un filtro excitador que oscile entre 400 y 500 nm y un máximo de 440 nm y un filtro de barrera de 500-520 nm. Consultar al fabricante del microscopio de fluorescencia recomendaciones de filtros adecuados para la fluorescencia del blanco de calcoflúor.

PROCEDIMIENTO
Colocar el cuentagotas en el triturador de la ampolla reutilizable que se suministra ya montado. Sostener el cuentagotas /triturador en posición vertical y golpear suavemente la base para liberar las burbujas que puedan haberse formado. Sujetar la parte media del cuentagotas/triturador con el pulgar y el índice y, apartando la punta, apretar suavemente para aplastar la ampolla. Invertir el cuentagotas y apretar suavemente para dispensar gota a gota.

Elementos fúngicos y levaduras:
1. Colocar la muestra en un portaobjetos de vidrio limpio y dejar secar en un calentador a 60ºC.
2. Añadir una gota de BactiDrop Hidróxido de potasio (10%) y mezclar suavemente.
3. Añadir una gota de BactiDrop Blanco de Calcoflúor y mezclar suavemente.
4. Cubrir el portaobjetos con un cubre de vídrio limpio y examinar la muestra utilizando un microscopio de fluorescencia. Observar la fluorescencia y la morfología típica.

Quistes de *Acanthamoeba:*
1. Colocar la muestra en un portaobjetos de vídrio limpio y dejar secar al aire. Muestras adecuadas para preparación en el portaobjetos son raspaduras o biopsias de la córnea, úlceras de la conjuntiva o la córnea, la parafernalia de las lentes de contacto y muetras de agua concentradas de al menos 100 ml. Pueden utilizarse otras muestras si la infección está diseminada.
2. Fijar el portaobjetos en metanol durante 2 minutos.
3. También pueden utilizarse cortes en parafina (grosor, 6 µm). Preparar como se indica a continuación:
   a. Empapar el portaobjetos en xileno sustituido durante 1-2 minutos para quitar la parafina.
   b. Sumergir el portaobjetos en etanol al 100% doce veces.
   c. Sumergir el portaobjetos en etanol al 95% doce veces.
   d. Aclarar suavemente en agua desmineralizada y seguir con el paso 4.
4. Añadir una gota de BactiDrop Hidróxido de Potasio (10%) y mezclar suavemente.
5. Añadir una gota de BactiDrop Blanco de Calcoflúor y mezclar suavemente.
6. Teñir durante cinco minutos. Retirar el exceso de tinción aclarando con agua desmineralizada. Cubrir con un cubreobjetos de vídrio limpio y examinar la muestra utilizando un microscopio de fluorescencia. Observar la fluorescencia y la morfología típica.

Microsporidios:
1. Aunque la muestra más común es una muestra de heces reciente o conservada (formol o SAF), son también apropiadas otras muestras como tejidos, aspirados duodenales, orina concentrada, esputo, LCR, secreción nasal, LAB y conjuntiva. Deberá colocarse una muestra delgada (10 µl) en un portaobjetos de vídrio limpio y fijarse con calor en un calentador de portaobjetos a 60ºC hasta sequedad.
2. Fijar el portaobjetos en metanol durante 2 minutos.
3. Añadir una gota de BactiDrop Hidróxido de Potasio (10%) y mezclar suavemente.
4. Añadir una gota de BactiDrop Blanco de Calcoflúor y mezclar suavemente.
5. Teñir durante 1 minuto. Aclarar con agua desmineralizada para eliminar el exceso. Cubrir con un cubreobjetos de vidrio limpio y examinar la muestra utilizando un microscopio de fluorescencia. Observar la fluorescencia y la morfología típica.

Pneumocystis carinii:

1. Los LBA (10-25μ) concentrados o las muestras de tejido son las muestras de elección, ya que se observa reducción de la sensibilidad con el esputo inducido. Colocar la muestra en un portaobjetos de vídrio limpio y dejar secar al aire.
2. Fijar el portaobjetos en metanol durante 2 minutos.
3. Añadir una gota de BactiDrop Hidróxido de Potasio (10%) y mezclar suavemente.
4. Añadir una gota de BactiDrop Blanco de Calcoflúor y mezclar suavemente.
5. Teñir durante un minuto. Retirar el exceso de tinción aclarando con agua desmineralizada. Cubrir con un cubreobjetos de vídrio limpio y examinar la muestra utilizando un microscopio de fluorescencia. Observar la fluorescencia y la morfología típica.

INTERPRETACIÓN

Elementos fúngicos, levaduras -	Fluorescencia de color verde brillante con morfología típica
Quistes de *Acanthamoeba* -	Los quistes (10-25 µm) aparecen estriados y con doble pared con fluorescencia de color verde manzana brillante y citoplasma naranja brillante.
Microsporidios -	Fluorescencia de color verde manzana; esporas de microsporidios intestinales cuyo tamaño oscila entre 0,9-1,5 µm y 1,2-2,0 µm, la pared aparece brillante, pero la tinción no es específica.
Pneumocystis carinii -	Quistes de color verde manzana brillantes, los quistes son de 5 a 8 µm de diámetro y contienen hasta 8 esporozoitos en forma de cuarto creciente o pleomorfos; la pared celular y las estructuras en doble paréntesis en el interior de los quistes se tiñen intensamente.
Bacterias -	Fluorescencia débil o ausencia de fluorescencia; forma cocoidal o bacilar típica

CONTROL DE CALIDAD

Todos los números de lote de BactiDrop Blanco de Calcoflúor se han ensayado utilizando los siguientes microorganismos de control de calidad y se han encontrado aceptables. El análisis de los microorganismos control debe realizarse de acuerdo con procedimientos de control de calidad analíticos establecidos. Si se observan resultados anómalos en el control de calidad, no deben informarse los resultados de los pacientes.

CONTROL	RESULTADOS
Trichophyton mentagrophytes ATCC® 9533	Fluorescencia verde brillante
Escherichia coli ATCC® 25922	Fluorescencia de débil a ausente

LIMITACIONES

1. El blanco de calcoflúor es un iluminador fluorescente que contribuye a la detección de ciertos microorganismos por medio de la delineación morfológica. La identificación definitiva puede precisar otras pruebas bioquímicas y serológicas o la confirmación mediante otra técnica de tinción.
2. Los estudios indican que la cápsula de *Cryptococcus* no se teñirá con blanco de calcoflúor. Se recomiendan técnicas alternativas, como el examen directo utilizando tinta china, para la detección de este microorganismo.[4]
3. Varios tipos de restos pueden emitir fluorescencia. Las bacterias también pueden emitir fluorescencia pero con menos brillo que los hongos.
4. Deben añadirse los reactivos hidróxido de potasio (10%) y blanco de calcoflúor a *Pneumocystis carinii, Acanthamoeba* y microsporidios para que emitan fluorescencia adecuada.
5. La fluorescencia inducida por un iluminador se difumina con la visión prolongada, en especial en los cortes finos, pero se puede restaurar la fluorescencia volviendo a tenir.[11]
6. Si una muestra contienen exceso de restos inespecíficos o levaduras, hay que realizar un ulterior examen en busca de microsporidios utilizando otro método de tinción. Todos los positivos para microsporidios deben confirmarse con la tinción de tricromo modificada.[9]

BIBLIOGRAFÍA

1. Darken, M. 1961. Science. 133:1704-1705.
2. Hageage, G.J. and B.J. Hamngton. 1984. Lab. Med. 15:109-112.
3. Monheit, J.E., D.F. Cowan, and D.G. Moore. 1984. Arch. Pathol. Lab. Med. 108:616-618.
4. Al-Doory, Y., R.J. Yankey, and M.L. Elgart. 1985. Lab. Mgment. 23:63-68.
5. Cemak, P. Methodist Hospital, Houston, TX. 1987. Data on file. Remel, Lenexa, KS.
6. Baselski, V.S. and M.K. Robison. 1989. Am. Clin. Lab. 8:36-37.
7. Milligan, T. 1992. J. Clin. Microbiol. 30:754.
8. Wilhelmus, K.R., M.S. Osato, R.L. Font, N.M. Robinson, and D.B. Dones. 1986. Arch. Opthamol. 104:1309-1312.
9. Weber, R., R.T. Bryan, D.A. Schwartz, and R.L. Owen. 1994. Clin. Microbiol. Rev. 7:426-461.
10. Versalovic, J., K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and D.W. Warnock. 2011. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore MD.

PRESENTACIÓN

BactiDrop Blanco de Calcoflúor (0,75 ml/Ampolla):
REF R21507 ....50 Ampollas/envase

Leyenda de los Símbolos

REF	Número de catálogo
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*
LAB	Para el uso del laboratorio
	Consulte las instrucciones de uso
	Límite de temperatura (temperatura de almacenamiento)
LOT	Código de lote (número de lote)
	Fecha de caducidad
EC REP	Representante autorizado en Europa
	Fabricante

12076 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK



Para obtener asistencia técnica póngase en contacto con su distribuidor local.

CAS (Nº de registro del servicio de resúmenes químicos)

IFU 21507, Revisado el 2014-06-18 Impreso en Estados Unidos.